



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 44 46 342 A 1**

⑤① Int. Cl. 6:
A 01 H 5/00
A 01 H 1/06
C 12 N 15/82
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/34

⑳ Aktenzeichen: P 44 46 342.1
㉑ Anmeldetag: 23. 12. 94
㉒ Offenlegungstag: 29. 8. 96

DE 44 46 342 A 1

㉑ Anmelder:

Bayer AG, 51373 Leverkusen, DE;
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, 14195 Berlin, DE

㉒ Vertreter:

Gremm, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 51467 Bergisch
Gladbach

㉓ Erfinder:

Lechelt-Kunze, Christa, Dr., 50935 Köln, DE; Hain,
Rüdiger, Dr., 40764 Langenfeld, DE; Strittmatter,
Günther, Dr., 50935 Köln, DE

㉔ Verwendung von DNA-Sequenzen

㉕ Die Erfindung betrifft die Verwendung bestimmter Desoxyribonukleinsäure Sequenzen (DNA-Sequenzen) sowie bestimmter Pflanzen, die diese DNA-Sequenzen enthalten, zum Auffinden chemischer Substanzen, welche pflanzliche Abwehrmechanismen induzieren können.

DE 44 46 342 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung bestimmter Desoxyribonukleinsäure Sequenzen (DNA-Sequenzen) sowie bestimmter Pflanzen, die diese DNA-Sequenzen enthalten, zum Auffinden chemischer Substanzen, welche pflanzliche Abwehrmechanismen induzieren können.

Die meisten heute bekannten Pflanzenschutzmittel entfalten eine unmittelbare Wirkung gegen die jeweils zu bekämpfenden Schädlinge. Viele Pflanzen verfügen über eigene Abwehrmechanismen, die mehr oder weniger ausgeprägt, bei einem Befall durch Schädlinge, insbesondere durch die hierbei auftretenden Verwundungen des Pflanzengewebes induziert werden. Diese natürliche Induktion von Pflanzenabwehrmechanismen reicht jedoch bei einem Schädlingsbefall meist nicht aus, um größere Schäden zu verhindern, da ihre Wirkung häufig erst mit Verzögerung eintritt, nachdem bereits erhebliche Schäden entstanden sind. Gezielte Pflanzenschutzmaßnahmen sind daher in Landwirtschaft und Gartenbau nicht verzichtbar. Da jedoch angestrebt wird, die natürlichen Abwehrmechanismen verstärkt in den Pflanzenschutz einzubeziehen, ist es erforderlich, chemische Stoffe (synthetische oder natürliche niedermolekulare Stoffe) aufzufinden, die nach einer gezielten und rechtzeitigen Anwendung geeignet sind, die pflanzeneigenen Abwehrmechanismen (z. B. Bildung von Stoffen, die für die Schädlinge toxisch sind oder die Schädlinge repellieren oder von Stoffen, die Gewebsnekrosen erzeugen und somit die weitere Verbreitung der Schädlinge verhindern) in einem genügenden Maße und ausreichend rasch zu induzieren, ohne hierbei unerwünschte Wirkungen hervorzurufen.

Das Auffinden solcher geeigneter chemischer Stoffe hat sich bisher als schwierig und aufwendig erwiesen. Es besteht daher ein starkes Bedürfnis, einfach durchzuführende Testmethoden zu entwickeln, um chemische Stoffe auch in großem Umfang auf ihr entsprechendes Induktionsvermögen zu testen.

Es ist bereits bekannt, bestimmte DNA-Sequenzen in das Genom von Pflanzen einzubauen, welche einen Promotor, der durch chemische Stoffe beeinflusst wird und eine Sequenz, welche für ein Enzym, das leicht nachweisbar ist codiert, enthalten und die so erhaltenen Pflanzen auf die Induzierbarkeit der Promotoren durch chemische Stoffe zu testen (vgl. EP-A 0 332 104). Die vorbeschriebenen Testsysteme verwenden jedoch alle sogenannte PR ("pathogen related")-Promotoren, welche, außer auf Pathogene, nicht nur auf chemische Stoffe sondern auch auf andere abiotische Stimuli (wie z. B. Verwundung, Wärme oder Belichtung, Licht/Dunkel-Zyklen, Schwermetalle) reagieren. Diese Testsysteme sind somit relativ störanfällig und können in einem erheblichen Maße zu Fehlinterpretationen und somit zu unrichtigen Ergebnissen führen.

Es wurde nun gefunden, daß das in Mol. Gen. Genet. (1993) 236 : 179—186 (N. Martini et al.) beschriebene DNA-Konstrukt, welches die unter der Bezeichnung EG 27 beschriebene DNA-Sequenz und zusätzlich die rbcS-3C Sequenz aus Erbse als 3'-Terminatorsequenz enthält, wobei dieses Konstrukt im folgenden "DNA-Sequenz I" genannt werden soll, in besonders vorteilhafter Weise verwendet werden kann, um chemische Stoffe aufzufinden, die geeignet sein können, pflanzeneigene Abwehrmechanismen gegen Pflanzenschädlinge zu induzieren. Dieser Befund war außerordentlich überraschend, weil die Autoren dieser Publikation ausdrücklich darauf hinwiesen, daß der eingesetzte, aus Kartoffel stammende, prpl-1 Promotor spezifisch nur durch Pathogene und nicht durch pflanzenfremde abiotische Faktoren induziert werden kann. Bei Kenntnis dieser Publikation wäre eigentlich zu erwarten gewesen, daß die beschriebene DNA-Sequenz nicht auf chemische Stoffe als abiotischen Faktor in der gewünschten Art spezifisch reagieren würde. Die DNA-Sequenz I wird auch in der WO 93/19 188 beschrieben, wo sie im Zusammenhang mit der Erzeugung von Pflanzen verwendet wurde, die gegen Pilzbefall eine erhöhte Resistenz aufweisen.

Unter chemischen Stoffen sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung synthetische oder in der Natur vorkommende organische Verbindungen, vorzugsweise niedermolekulare organische Stoffe, verstanden werden, ganz besonders bevorzugt solche, welche nicht natürlich in Pflanzen als Elicitoren (also als Abwehrstoffe bzw. Abwehrmechanismen induzierende Substanzen) vorkommen und ganz besonders hervorgehoben solche, welche nicht natürlich in Pflanzen auftreten. Besonders bevorzugt sind synthetische organische niedermolekulare Stoffe, die nicht in der Natur vorkommen.

Bei der erfindungsgemäß verwendbaren DNA-Sequenz I handelt es sich um eine DNA-Sequenz, die aus den folgenden vier Bestandteilen besteht, die in direkter 5'-3'-Orientierung aufeinanderfolgen:

1. Eine Region des prpl-1 Promotors von Position — 402 bis — 130 (272 bp).
2. Eine sich daran anschließende Region (TATA box-Region) des CaMV 35S RNA Promotors (Positionen — 46 bis + 8).
3. Die sich hieran anschließende für β -Glucuronidase codierende Region des E. coli uidA Gens (GUS Gen).
4. Die sich daran anschließende Terminationssequenz des rbcS-3C Gens aus Erbse (Pisum sativum).

Der prpl-1 Promotor ist aus der oben aufgeführten Publikation bekannt. Der CaMV (Cauliflower mosaic virus) 35S Promotor sowie die rbcS-3C-Sequenz aus Erbse sind ebenfalls aus der Literatur bekannt (vgl. Benfey und Chua, 1990 Science 250: 959—960 und Fluhr et al., EMBO Journal Vol. 5, No. 9, 2063—2071, 1986). Das GUS Gen und seine Verwendung als Reporter-Gen wurden in der US-Patentschrift Nr. 5 268 463 sowie in Jefferson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, 8447—8451 beschrieben. Wie bereits erwähnt, wird das als DNA-Sequenz I bezeichnete Konstrukt in Mol. Gen. Genet. (1993) 236 : 179—186 sowie in der WO 93/19 188 beschrieben.

Der Escherichia coli Stamm E. coli GSpEtVgus 27-1 enthält das Plasmid pETVgus27-1, welches die erfindungsgemäß verwendbare DNA-Sequenz I trägt. Dieser E. coli Stamm wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland in Übereinstimmung mit den Bestimmungen des Budapester Vertrages über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren hinterlegt. Er erhielt die Hinterlegungsnummer DSM 9627 (Hinterlegungsdatum: 20.12.1994).

Das Plasmid pETVgus27-1, sein Aufbau, seine Zusammensetzung sowie seine Verwendung zur Erzeugung von transgenen Kartoffelpflanzen werden ebenfalls in Mol. Gen. Genet. (1993) 236: 179—186 beschrieben. Es kann nach den allgemein üblichen Methoden aus dem *E. coli* Stamm GSpEtVgus 27-1 isoliert werden.

Unter dem Begriff DNA-Sequenz I wird die aus den oben aufgeführten Bestandteilen 1. bis 4. zusammengesetzte DNA-Sequenz verstanden. Dieser Begriff schließt jedoch auch von der DNA-Sequenz I abgeleitete DNA-Sequenzen ein. Abgeleitete DNA-Sequenzen sind solche DNA-Sequenzen, die im wesentlichen der DNA-Sequenz I entsprechen und erfindungsgemäß verwendet werden können. Es handelt sich hierbei beispielsweise um DNA-Abschnitte, die die DNA-Sequenz I so enthalten, daß ihre erfindungsgemäße Funktion nicht oder nicht wesentlich beeinträchtigt ist. Solche DNA-Abschnitte können beispielsweise entstehen, wenn die DNA-Sequenz I aus einem größeren DNA-Stück mit Hilfe von Restriktionsenzymen herausgeschnitten wird. Die DNA-Sequenz I kann auch an ihren Enden solche DNA-Sequenzen tragen, welche für ihre Handhabung jeweils angepaßt sind (z. B. sogenannte "linker"). Weiterhin können in der DNA-Sequenz I eine oder mehrere DNAs oder DNA-Abschnitte durch andere im wesentlichen gleichwirkende DNAs oder DNA-Abschnitte ersetzt sein, wie sich dies z. B. aus der Variation von DNA aufgrund der Degenerierung des genetischen Codes ergeben kann.

Zur erfindungsgemäßen Verwendung wird die DNA-Sequenz I in das Genom von Pflanzen eingebaut. Die hierbei entstehenden transgenen Pflanzen oder Teile dieser Pflanzen, wie Blätter, Stengel, Wurzeln, Blüten und Samen oder deren Teile oder Zellen (einschließlich Protoplasten), Kalli usw. werden mit den auf ihre induzierende Wirksamkeit hin zu untersuchenden chemischen Stoffen in Berührung gebracht. Falls eine solche induzierende Wirksamkeit vorliegt, wird durch die GUS Sequenz das Enzym β -Glucuronidase gebildet, welches bzw. dessen Aktivität nach den üblichen Methoden qualitativ oder quantitativ bestimmt werden kann. Auf diese Weise ist es möglich, einfach durchzuführende Testsysteme aufzubauen, mit deren Hilfe auch größere Zahlen von Testsubstanzen relativ schnell und sicher auf ihre induzierenden Eigenschaften geprüft werden können. Ein besonderer Vorteil dieses Testsystems liegt auch darin, daß Stoffe mit einem positiven Befund nicht nur den prpl-1 Promotor aktivieren, sondern generell geeignet sind, auch andere Promotoren von pflanzlichen Schädlingsabwehr-Genen, insbesondere PR-Promotoren, zu induzieren. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Methode können somit aus einer Vielzahl von chemischen Stoffen rasch und zuverlässig geeignete Verbindungen ermittelt werden, die dann gegebenenfalls gezielt zu weiteren Untersuchungen eingesetzt werden können. Die vorliegende Erfindung betrifft somit eine Testmethode, gemäß welcher mit Hilfe eines einfachen Routineverfahrens aus einer Vielzahl von organischen Verbindungen solche selektiert werden können, die pflanzliche Schädlingsabwehr-Gene induzieren können und welche somit als Pflanzenschutzmittel zur Schädlingsbekämpfung in Frage kommen. Bei den zu induzierenden pflanzlichen Abwehr-Genen handelt es sich vorzugsweise um Gene, die für die Abwehr der Pflanzen gegen einen Befall durch phytopathogene mikrobielle Schädlinge, vorzugsweise durch Pilze, Bakterien oder Viren, besonders bevorzugt durch phytopathogene Pilze verantwortlich sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch die Verwendung von transgenen Pflanzen oder Pflanzenteilen, die die DNA-Sequenz I oder eine davon abgeleitete DNA-Sequenz in ihrem Genom enthalten, zum Auffinden von chemischen Stoffen, die geeignet sein können, pflanzeneigene Abwehrmechanismen gegen Pflanzenschädlinge zu induzieren.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung somit auch ein Verfahren zum Auffinden von chemischen Stoffen, die geeignet sein können, pflanzeneigene Abwehrmechanismen gegen Pflanzenschädlinge zu induzieren, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man transgene Pflanzen oder Pflanzenteile, die in ihrem Genom die DNA-Sequenz I oder eine davon abgeleitete DNA-Sequenz enthalten, mit den auf ihre induzierende Wirksamkeit zu untersuchenden chemischen Stoffen in Berührung bringt, und die Stoffe, die eine erhöhte Expression von β -Glucuronidase hervorrufen, auswählt.

Als erfindungsgemäß verwendbare Testpflanzen, welche die DNA-Sequenz I in ihrem Genom enthalten, können praktisch alle Pflanzen herangezogen werden. Vorzugsweise wird man solche Pflanzen einsetzen, bei denen die aufgefundenen Resistenzinduktoren zur Schädlingsbekämpfung verwendet werden sollen. Hierzu gehören vor allem Pflanzen, die für Landwirtschaft und Forsten, für den Zierpflanzenanbau, den Heilpflanzenanbau und die Pflanzenzucht von Interesse sind. Besonders bevorzugt werden jedoch als Testpflanzen solche Pflanzen eingesetzt, welche in einem Testlabor leicht zu handhaben sind und sich auch rasch und einfach vermehren lassen. Als ganz besonders bevorzugte transgene Pflanzen seien *Arabidopsis thaliana*, Tomate und Tabak, insbesondere Tabak genannt. Bei Kenntnis des Standes der Technik war es, wie oben ausgeführt, überraschend, daß der erfindungsgemäß eingesetzte Promotor auf abiotische Einflüsse reagiert. Es war darüber hinaus auch nicht vorhersehbar und muß ebenso als überraschend angesehen werden, daß der erfindungsgemäß einsetzbare Promotor nicht nur in Kartoffel (Herkunft des prpl-1-Promotors), sondern praktisch in allen Pflanzen die erfindungsgemäß nutzbare Wirkung entfaltet.

Zur vorliegenden Erfindung gehören auch neue Pflanzen (einschließlich der Pflanzenteile und Vermehrungsmaterial, wie Samen, Ableger, Knollen, Zellen, Protoplasten, Kalli usw.), die in ihrem Genom die DNA-Sequenz I enthalten. Zu den neuen Pflanzen zählen alle Pflanzen, ausschließlich die bereits aus Mol. Gen. Genet. (1993) 236: 179—186 bekannte Kartoffel. Bevorzugte erfindungsgemäße neue Pflanzen sind *Arabidopsis thaliana*, Tomate und Tabak, ganz bevorzugt Tabak.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung der neuen erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen (einschließlich der Pflanzenteile und des Vermehrungsmaterials), welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- (a) die DNA-Sequenz I oder eine davon abgeleitete DNA-Sequenz in das Genom von Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten) einsetzt und gegebenenfalls,
- (b) aus den transformierten Pflanzenzellen vollständige transformierte Pflanzen regeneriert und gegebenenfalls vermehrt, und gegebenenfalls

(c) von den so erhaltenen transgenen Pflanzen der Elterngeneration oder weiterer daraus gewonnenen Generationen die gewünschten Pflanzenteile einschließlich Vermehrungsmaterial gewinnt.

Die Verfahrensschritte (a), (b), und (c) können nach bekannten Verfahren und Methoden in üblicher Weise durchgeführt werden.

Zur vorliegenden Erfindung gehört auch ein Test-"Kit", also eine Zusammenstellung der benötigten Geräte, Reagentien und Vermehrungsmaterial zur Heranzucht der transgenen Testpflanzen, mit deren Hilfe die erfindungsgemäße Testmethode ohne weiteres durchgeführt werden kann. Der Test-"Kit" enthält vorzugsweise die Geräte und Reagentien, die normalerweise in den einschlägigen Testlabors nicht routinemäßig zur Verfügung stehen. Vorzugsweise enthält der Test-"Kit" Vermehrungsmaterial (vorzugsweise Samen) der erfindungsgemäß verwendbaren transgenen Pflanzen, Gewebekulturschalen mit Trägernetzen (Siebgewebe), das Anzuchtmedium, GUS-Extraktionspuffer, Methylumbelliferylglucuronid, Mikrotiterplatten, gegebenenfalls ein Fluoreszenz-Plattenlesegerät, eines Säugerät und sonstige Reaktionsgefäße, insbesondere den Samen der Testpflanzen.

Zur Durchführung der Testmethode werden die zu testenden organisch chemischen Stoffe vorzugsweise in Wasser gelöst. Bei in Wasser schwerlöslichen Stoffen wird vorzugsweise zunächst eine Lösung in einem physiologisch verträglichen organischen Lösungsmittel, wie Aceton, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Methanol oder Ethanol hergestellt. Diese Lösung wird anschließend mit Wasser verdünnt. Vorzugsweise soll die Testlösung weniger als 5% (Gewichtsprozente), besonders bevorzugt weniger als 1% organisches Lösungsmittel enthalten.

Die Konzentration der Testsubstanzen in der Testlösung kann über einen weiten Bereich schwanken und hängt ab von der Löslichkeit der Testsubstanzen und den jeweiligen Details der Testdurchführung, z. B. der Empfindlichkeit der Testpflanzen oder der für den Test ausgewählten Pflanzenteile und kann durch den Fachmann in einfachen Routineversuchen, z. B. mit Hilfe bekannter Resistenzinduktoren, wie z. B. Na-Salicylat, Dichlorisonikotinsäure oder Probenazol ermittelt werden. Diese Substanzen können auch verwendet werden, um das Testsystem auf seine Funktionsfähigkeit zu überprüfen und zu kalibrieren sowie hinsichtlich der jeweiligen Gegebenheiten zu optimieren. Vorzugsweise werden die Testsubstanzen in einer Konzentration von 5 µM bis 20 000 µM, besonders bevorzugt von 100 µM bis 10 000 µM und ganz besonders bevorzugt von 50 µM bis 5000 µM eingesetzt. Im Falle stark saurer oder stark basischer Verbindungen kann es zweckmäßig sein, den pH-Wert durch die Zugabe der üblichen Pufferlösungen in einen physiologisch annehmbaren Bereich zu bringen (vorzugsweise pH 4,5 bis 7,5). Im allgemeinen ist eine solche pH-Werteinstellung jedoch nicht erforderlich. Für eine oberflächige Anwendung kann zur besseren Benetzung des Pflanzenmaterials auch eines der üblichen Netzmittel hinzugefügt werden, wobei darauf zu achten ist, daß das eingesetzte Netzmittel selbst keine induzierenden Eigenschaften aufweist.

Wie bereits oben ausgeführt wurde, können für die erfindungsgemäße Testmethode die Testpflanzen in Form der vollständigen Pflanzen oder aber in Form von Pflanzenteilen, vorzugsweise in Form von Blättern, Blatteilen oder Stengeln bzw. Teilen von Stengeln eingesetzt werden. Die Testpflanzen, welche als solche oder in Form von Pflanzenteilen oder von daraus gewonnenen Teilen (z. B. Blattstückchen) eingesetzt werden, sollten wenigstens das 4-Blattstadium erreicht haben, also wenigstens erste nach den Keimblättern wachsende voll ausgebildete Blätter aufweisen. Bei Tabak wird dieses Stadium, ausgehend von Samen, abhängig von den vorliegenden Bedingungen (beispielsweise bei 21°C) nach etwa 14 bis 21 Tagen erreicht. Gegebenenfalls kann es zweckmäßig sein, die jungen Pflanzen in der Anzuchtperiode vor allzu großer Wasserverdunstung, z. B. durch Abdecken, zu schützen. Die Größe und das Alter der Testpflanzen kann weitgehend variiert werden. Zweckmäßigerweise und vorzugsweise verwendet man kleine und junge Pflanzen, welche das 4-Blattstadium oder das darauf folgende Wachstumsstadium erreicht haben. Besonders bevorzugt werden die Testpflanzen im 4-Blattstadium eingesetzt.

Die gelösten Testsubstanzen können in beliebiger Weise mit den Pflanzen oder dem Pflanzenmaterial in Kontakt gebracht werden, z. B. durch Aufsprühen oder Aufpinseln. Das Pflanzenmaterial kann auch in die Lösungen der Testsubstanzen eingetaucht oder eingelegt werden. Neben diesen Methoden der oberflächigen Aufbringung, ist es auch möglich, eine Aufnahme der Testsubstanzen über die Wurzeln oder Leitungsbahnen der Pflanze oder Pflanzenteile zu erreichen. Hierzu werden die Wurzeln der intakten Pflanzen, Pflanzenstengel oder Blattstiele in die Testlösungen für eine ausreichend lange Zeit, die die Aufnahme der Testsubstanzen erlaubt, eingetaucht. Vorzugsweise erfolgt die Applikation über die Wurzeln. Die Einwirkzeit liegt vorzugsweise zwischen 1 und 96, besonders bevorzugt zwischen 2 und 72 und ganz besonders bevorzugt zwischen 24 und 48 Stunden. Die Inkubation erfolgt vorzugsweise unter normaler Belichtung oder Belichtung in einem üblichen Lichtschrank, wobei zweckmäßigerweise der für die Pflanzen übliche Licht-Dunkel-Rhythmus (z. B. 16 h Licht, 8 h Dunkel) eingehalten wird. Die Inkubation wird vorzugsweise bei Temperaturen zwischen 15 und 30°C, besonders bevorzugt zwischen 18 und 28°C vorgenommen. Nach der Inkubation kann die Glucuronidaseaktivität direkt bestimmt werden oder das Material, z. B. tiefgefroren für eine spätere Auswertung aufbewahrt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden für den Test ausgestanzte Blattscheiben (z. B. Durchmesser: 5 bis 10 mm) von vollausgebildeten Blättern der transgenen Pflanzen, vorzugsweise Tabakpflanzen, eingesetzt. Die Blattscheiben werden in die Lösungen der Testsubstanzen eingelegt (beispielsweise können die Testlösungen in den Vertiefungen von üblichen Lochplatten enthalten sein, in die die Blattscheiben eingelegt werden). Die Inkubation wird, wie oben beschrieben, durchgeführt (z. B. 24 h bei 25°C im Lichtschrank mit einem 16 h Licht, 8 h Dunkel Rhythmus).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Applikation der Testsubstanzen über die Wurzeln von jungen Testpflanzen, vorzugsweise Tabakpflanzen, welche vorzugsweise im 4-Blattstadium vorliegen. Die Substanzen werden hierbei durch die Wurzel aufgenommen und über das Leitgewebe in der Pflanze verteilt. Nach der, wie oben beschrieben erfolgten, Inkubation, werden die Wurzeln entfernt und

verworfen. Der Rest der Pflanzen wird für die Glucuronidaseaktivitätsbestimmung verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden zunächst junge Testpflanzen, vorzugsweise Tabakpflanzen, dadurch erzeugt, daß man Samen auf kleine Netze bzw. Siebgewebe auflegt, die auf einer geeigneten Nährlösung (z. B. Linsmaier-Skoog (LS)-Medium) schwimmen. Das Material dieser Netze soll leicht genug sein, daß sie auf der Testlösung schwimmen können. Als besonders geeignet hat sich ein Netzgewebe bzw. Siebgewebe aus Polypropylen erwiesen, welches zugleich den Vorteil einer leichten Sterilisierbarkeit aufweist. Die Größe der Netze hängt zweckmäßigerweise von der Größe der jeweiligen Behältnisse ab, die die Testlösung enthalten. Die Maschenweite der Netze muß so gewählt werden, daß die Samen der verwendeten Testpflanzen nicht hindurch fallen können. Als Behältnisse für die Nährlösung können hierbei übliche Lochplatten (z. B. Microtiter Platten) verwendet werden (welche beispielsweise einen Durchmesser von etwa 25 mm aufweisen und 3 bis 4 ml Testlösung aufnehmen können). Man läßt die Samen unter den üblichen Bedingungen (beispielsweise bei einer Temperatur von 21°C) auskeimen und die kleinen Pflanzen solange wachsen, bis die Wurzeln in die Nährlösung gewachsen sind. Etwa 10 bis 30 Tage nach dem Auskeimen, also nachdem das 4-Blattstadium erreicht wurde, wird das Nährmedium durch die Testsubstanzlösungen ersetzt. Nach der, wie oben beschrieben, durchgeführten Inkubation werden die Wurzeln der kleinen Pflanzen abgetrennt und verworfen. Der Rest des Pflanzenmaterials wird für die Auswertung verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Keimung der Samen, vorzugsweise Tabaksamen, ebenfalls, wie oben beschrieben, auf kleinen Netzen, die auf dem Nährmedium schwimmen. Die Applikation der Testsubstanzen erfolgt jedoch über die Blätter, indem man die kleinen Pflanzen (mit dem Trägernetz entnimmt, umdreht und den oberen Teil ("kopfüber") in die Testlösung eintaucht. Die Inkubation erfolgt, wie oben beschrieben. Auch in diesem Fall wird der Wurzelteil abgetrennt und verworfen und der restliche Teil für die Auswertung verwendet.

Die Bestimmung der Glucuronidase, die gebildet wird, falls die entsprechende Testsubstanz über Schädlingsresistenz-Gen-induzierende Eigenschaften aufweist, erfolgt in bekannter Weise oder nach allgemein üblichen Methoden (vgl. EP-A 0 332 104 und US-Patentschrift Nr. 5 268 463), vorzugsweise über die Bestimmung der Enzymaktivität. Für die Untersuchung einer größeren Zahl von Testsubstanzen hat sich die bekannte Bestimmungsmethode mit Hilfe des fluorometrisch meßbaren Methylumbelliferylglucuronid als besonders zweckmäßig erwiesen. Eine besonders günstige Ausführungsform der Bestimmung der Glucuronidaseaktivität wird unten beschrieben (vgl. experimenteller Teil).

Falls sich bei der Durchführung der erfindungsgemäßen Testmethode ein Wert ergibt, der wenigstens 2- bis 10fach höher liegt, als der Wert, der nur mit Wasser als Testlösung erhalten wird, welches gegebenenfalls das verwendete organische Lösungsmittel und/oder das verwendete oberflächenaktive Mittel in der entsprechenden Konzentration enthält, liegt eine Testsubstanz vor, von der auszugehen ist, daß sie die gesuchten induzierenden Eigenschaften aufweist. Die Höhe der gemessenen GUS-Aktivität (in pMol MU/mg Protein) korreliert meist mit der Stärke des Induktionsvermögens der jeweiligen Testsubstanz.

Transgene Pflanzen, die die DNA-Sequenz I in ihrem Genom enthalten und die für die erfindungsgemäße Testmethode als Testpflanzen verwendet werden können, sind nach den allgemein üblichen Methoden erhältlich. Die Erzeugung entsprechender Kartoffel-Pflanzen wird in Mol. Gen. Genet. (1993) 236: 179-186 beschrieben. Für die Transformation der Pflanzen kann in besonders vorteilhafter Weise das Plasmid pETVgus27-1 direkt eingesetzt werden, so daß es demnach nicht erforderlich ist, die Sequenz I zu isolieren. In entsprechender Weise können auch die erfindungsgemäßen neuen transgenen Pflanzen erhalten werden.

Eine Anzahl verschiedener Methoden steht zur Verfügung, die DNA-Sequenz I in das genetische Material von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen einzusetzen, wie bereits ausgeführt, kann der DNA-Transfer nach den allgemein üblichen bekannten Methoden erfolgen, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln und durchführen kann.

Alle im vorliegenden Text aufgeführten Prozentangaben beziehen sich, wenn nichts anderes angegeben auf Gewichtsprozent.

Das erfindungsgemäße Testverfahren sowie die Erzeugung der erfindungsgemäß verwendbaren transgenen Pflanzen soll durch die folgenden, nicht beschränkend wirkenden Beispiele erläutert werden.

Beispiele

I. Beispiel A (Testverfahren)

1. Test an Blattscheiben von transgenen prpl-1/GUS Tabakpflanzen

Wäßrige Testlösungen verschiedener zu testender Chemikalien/Wirkstoffe werden in die Vertiefungen von Mikrotiter Platten aliquotiert, z. B. 500 µl in die Vertiefung einer 24 Loch Platte. Mit einem Korkbohrer werden Blattscheiben von vollausgebildeten Blättern ausgestanzt, z. B. 7 mm Durchmesser. Die Blätter stammen von Gewächshauspflanzen oder von sterilen in vitro Pflanzen (Regenerate von Transformationen). Blattscheiben werden in die mit Testlösung gefüllten Vertiefungen der Lochplatten eingelegt und bei 25°C im Lichtschrank für z. B. 24 h inkubiert (16 h Licht, 8 h Dunkel).

Nach Inkubation werden die Blattscheiben in flüssig Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2. Test an Keimlingen von transgenen prpl-1/GUS Tabakpflanzen

Anzucht:

6-Loch Microtiter Platten (Falcon®) werden mit 4 ml Linsmaier-Skoog (LS)-Medium (Linsmaier und Skoog

1965) pro Vertiefung gefüllt. Passend geschnittenes, autoklaviertes Polypropylen Sieb gewebe (PP-Netze) mit 500 µm Maschenweite wird auf das LS-Medium aufgelegt. Das Siebgewebe schwimmt auf der Flüssigkeit. 4 Tabaksamen pro Vertiefung werden auf die Netzen aufgelegt. Die Samen haben mit dem Medium durch die Maschen Berührung und können quellen und keimen.

5 Keimung und Wachstum erfolgt bei 21°C im Lichtschrank (16 h Licht/ 8 h Dunkel Rhythmus) für 14 bis 21 Tage. Die Platten werden mit den zugehörigen Deckeln abgedeckt und zusätzlich seitlich mit einer farblosen, lichtdurchlässigen Folie (z. B. Parafilm™) abgeklebt, um das Verdunsten des Mediums zu verhindern. Nach Keimung der Samen nach ca. 7 Tagen bei den beschriebenen Versuchsbedingungen wachsen die Wurzeln ins Medium, die Blätter in den verbliebenen Luftraum. Es entstehen Minipflanzen, mit 4—6 Blättern.

10 3. Applikation von Testsubstanzen

14—21 Tage nach Keimung der Samen auf den PP-Netzen wird das LS-Medium abgesaugt und durch wäßrige Lösung ersetzt, die die Testsubstanzen in einer Konzentration von 100 µM—1 mM enthält. Die Inkubation erfolgt bei 25°C im Lichtschrank (16 h Licht/8 h Dunkel) für 24 h und 48 h. Die Substanzen werden durch die Wurzel aufgenommen und über das Leitgewebe in der Pflanze verteilt. Um die Transpiration und damit die Wirkstoffaufnahme zu verbessern wird die Mikrotiterplatte während der Wirkstoffapplikation nicht mit der Folie (Parafilm™) umschlossen.

15 Eine Blattapplikation ist bei Keimung auf PP-Netzen ebenfalls möglich. Die Trägernetze werden hierzu mit Keimlingen entnommen und kopfüber in eine Testlösung eingetaucht. Die Substanzaufnahme kann durch Anlegen eines Vakuums (Vakuuminfiltration) erleichtert werden.

20 Nach Inkubation mit Testsubstanzen werden die Keimlinge mittels Skalpell von den Wurzeln abgeschnitten, in Polypropylen-Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Wurzeln der Tabakkeimlinge werden verworfen.

25 4. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials, Herstellung eines Proteinrohextraktes

Das gefrorene Pflanzenmaterial wird in GUS-Extraktionspuffer mittels eines Homogenisators (z. B. Kinematica®) aufgeschlossen. Zelltrümmer werden durch 15minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 13 000 g sedimentiert. Der wäßrige Überstand wird abgehoben und für die Bestimmung der GUS-Enzymaktivität und Bestimmung des Proteingehalts eingesetzt.

30 GUS-Extraktionspuffer: 50 mM Na-Phosphat pH=7.0, 10 mM EDTA, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 0.1% ungeladenes Detergens (Triton X-100), 0.1% Na-Laurylsarkosin.

35 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung in den Rohextrakten erfolgte nach Bradford M.H., 1976 Anal. Biochem. 72, 248—254. Eichsubstanz ist Rinderserumalbumin.

40 5. GUS-Enzymtest

100 µl Proteinrohextrakt werden mit 100 µl GUS-Extraktionspuffer und 4 µl 50 mM Methylumbelliferylglucuronid (MUG) gemischt. Endkonzentration des GUS-Substrates MUG im Enzymtest ist 1 mM. 100 µl des Reaktionsgemisches werden zu 900 µl 0.2 M Na₂CO₃ gegeben, wodurch die Enzymreaktion der β-Glucuronidase gestoppt wird (0 Min.-Wert). Die restlichen 100 µl des Ansatzes werden bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 45 900 µl 0.2 M Na₂CO₃ wird die Enzymreaktion nach 60 Min. abgestoppt (60 Min.-Wert). Das durch Glukuronidabspaltung entstandene Methylumbelliferon wird im Fluoreszenz-Spektrometer bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und Emissionswellenlänge von 455 nm nachgewiesen. Aus der Differenz der Fluoreszenz nach 60 Minuten und 0 Minuten Reaktionszeit kann die gebildete Menge (in pMol) an Methyumbelliferon durch im 50 Extrakt befindliche β-Glukuronidase bestimmt werden. Eichsubstanz ist käufliches Methylumbelliferon von Sigma.

Die spezifische Enzymaktivität errechnet sich aus pMol Methylumbelliferon pro Minute pro mg Protein.

Nähere Angaben zu verwendeten Reagenzien und Geräten:

55 Falcon™

Becton Dickinson & Company
Lincoln Park N.J. 07035 USA

60 Parafilm™

American Can. Co. Greenwich C.T. 06830 USA

4-Methylumbelliferyl-β-D-glukuronid Dihydrat

65 BioSynth AG, 9422 Staad, Schweiz

DE 44 46 342 A1

Methylumbelliferon und Triton X-100

M 1508, Sigma-Aldrich Vertriebs GMBH, 82039 Deisenhofen
Sigma Chemical Company, St. Louis M.O. 63178 USA

EDTA

Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
E. Merck, D6100-Darmstadt, BRD

N-Laurylsarkosin

Sigma L5125

Linsmaier-Bednar and Skoog Plant salts

Serva 47513
Serva Feinbiochemica, 69042 Heidelberg, BRD

Versuchsergebnisse

a) GUS-Aktivität in transgenen prpl-1/GUS Tabakkeimlingen nach Wurzelapplikation von Wirkstoffen und
Inkubation von 6, 24 und 48 Std.

GUS-Aktivität in pMol Methylumbelliferon/Minute/mg Protein

Testsubstanzen	Molarität	6 h	24 h	48 h
H ₂ O Kontrolle		116	182	116
Na-Salicylat	10 mM	1009	1852	1173
Na-Salicylat	5 mM	969	1802	2361
Chlorsalicylat	1 mM	859	1424	1988
1 % Aceton Kontrolle		54	82	87
Dichlorisonikontinsäure	1 mM	831	1905	3013
0,5 % DMF Kontrolle		37	60	136
Probenazol	1 mM	107	380	1120

DE 44 46 342 A1

Stimulierungsfaktoren in transgenen Wirkstoff-behandelten Keimlingen

Jeweilige Lösungsmittelkontrolle ist gleich 1 gesetzt

Testsubstanzen	Molarität	6 h	24 h	48 h
H ₂ O Kontrolle		1	1	1
Na-Salicylat	10 mM	9	10	10
Na-Salicylat	5 mM	8	10	20
Chlorsalicylat	1 mM	7	8	17
1 % Aceton Kontrolle		1	1	1
Dichlorisonikontinsäure	1 mM	15	23	35
0,5 % DMF Kontrolle		1	1	1
Probenazol	1 mM	3	6	8

b) GUS-Aktivität in Blattscheiben von transgenen prpl-1/GUS Tabakpflanzen nach 24stündiger Inkubation in Natriumsalicylat in pMol/min/mg Protein

Pflanze	Salicylat (10 mM in Phosphatpuffer	Phosphatpuffer/ Kontrolle	Stimulationsfaktor Salicylat/Phosphatpuffer
1	9 100	480	19x
2	10 200	750	14x
3	4 600	240	19x
4	5 900	320	18x
5	4 900	320	15x
6	11 100	640	17x
7	3 600	270	13x
8	13 200	680	19x
9	12 600	670	19x
10	5 200	280	19x

II. Beispiel B (Erzeugung von transgenen Pflanzen)

1. Transformation von Tabak

a) Kultur von Tabakspossen und Isolierung von Tabakprotoplasten

Nicotiana tabacum (Petit Havana SR1) wird als sterile Sproßkultur auf hormonfreiem LS Medium (Linsmaier und Skoog 1965) vermehrt. In Abständen von ca. 6–8 Wochen werden Sproßabschnitte auf frisches LS-Medium umgesetzt. Die Sproßkulturen werden bei 12 h Licht (1000–3000 Lux) in einem Kulturraum bei 24–26°C gehalten.

Für die Isolierung von Blattprotoplasten werden ca. 2 g Blätter (ca. 3–5 cm lang) mit einer frischen Rasierklin-

ge in kleine Stücke (0,5 cm × 1 cm) geschnitten. Das Blattmaterial wird in 20 ml Enzymlösung, bestehend aus K3 Medium (Nagy und Maliga 1976), 0,4 M Saccharose, pH 5,6, 2% Zellulase R10 (Serva), 0,5% Macerozym R10 (Serva) für 14–16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Protoplasten durch Filtration über 0,30 mm und 0,1 mm Stahlsiebe von Zellresten getrennt. Das Filtrat wird 10 Minuten lang bei $100 \times g$ zentrifugiert. Während dieser Zentrifugation flotieren intakte Protoplasten und sammeln sich in einer Bande am oberen Rand der Enzymlösung. Das Pellet aus Zellresten und die Enzymlösung werden mit einer Glaskapillare abgesaugt. Die vorgereinigten Protoplasten werden mit frischem K3 Medium (0,4 M Saccharose als Osmotikum) auf 10 ml aufgefüllt und erneut flotiert. Das Waschmedium wird abgesaugt und die Protoplasten werden für Kultur oder folgende Infektion mit Agrobakterien (Kokultur) auf $1-2 \times 10^5/\text{ml}$ verdünnt. Die Protoplastenkonzentration wird in einer Zählkammer bestimmt.

b) Transformation von regenerierenden Tabakprotoplasten durch Kokultur mit *Agrobacterium tumefaciens*

Es wird im folgenden die Methode von Marton et al. 1979 mit kleinen Veränderungen benutzt. Die Protoplasten werden wie beschrieben isoliert und in einer Dichte von $1-2 \times 10^5/\text{ml}$ in K3 Medium (0,4 M Saccharose, 0,1 mg/l NAA, 0,2 mg/l Kinetin) 2 Tage im Dunkeln und ein bis zwei Tage lang unter Schwachlicht (500 lux) bei 26°C inkubiert. Sobald die ersten Teilungen der Protoplasten auftreten, werden 30 µl einer Agrobakteriensuspension des Stammes GV3 101C58Clp MP90RK: pETVgus27-1 oder eines anderen geeigneten Agrobakterienstammes, der pETVgus27-1 enthält, in minimal A (Am) Medium (Dichte ca. 10^9 Agrobakterien/ml) zu 3 ml regenerierenden Protoplasten gegeben. Die Kokulturdauer beträgt 3–4 Tage bei 20°C im Dunkeln. Danach werden die Tabakzellen in 12 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt, mit Seewasser (600 mOsm/kg) auf 10 ml verdünnt und bei $60 \times g$ 10 Minuten lang pelletiert. Dieser Waschvorgang wird noch $1-2 \times$ wiederholt um den größten Teil der Agrobakterien zu entfernen. Die Zellsuspension wird in einer Dichte von $5 \times 10^4/\text{ml}$ in K3 Medium (0,3 M Saccharose) mit 1 mg/l NAA (Naphthyl-1-essigsäure), 0,2 mg/l Kinetin und 500 mg/l des Cephalosporin-Antibiotikums Cefotaxim kultiviert. Die Zellsuspension wird jede Woche mit frischem K3 Medium verdünnt und der osmotische Wert des Mediums graduell um 0,05 M Saccharose (ca. 60 mOsm/kg) pro Woche reduziert. Die Selektion mit Hygromycin (30 mg/l) Hygromycin B wird 2–3 Wochen nach der Kokultur in Agarose "bead type culture" (Shillito et al. 1983) gestartet. Hygromycinresistente Kolonien können 3–4 Wochen nach Beginn der Selektion vom Hintergrund zurückgebliebener Kolonien unterschieden werden.

c) Direkte Transformation von Tabakprotoplasten mit DNA. Calciumnitrat-PEG Transformation

In einer Petrischale werden ca. 10^6 Protoplasten in 180 µl K3 Medium mit 20 µl wäßriger DNA-Lösung, welche 0,5 µg/l des Plasmids pETVgus27-1 und 0,5 µg/l pLGV neo 2103 (Hain et al. 1985) enthält, vorsichtig gemischt. Anschließend werden 200 µl Fusionslösung (0,1 M Calciumnitrat, 0,45 M Mannit, 25% Polyethylenglykol (PEG 6000), pH 9) vorsichtig zugegeben. Nach 15 Minuten werden 5 ml Waschlösung (0,275 M Calciumnitrat pH 6) addiert und nach weiteren 5 Minuten werden die Protoplasten in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und bei $60 \times g$ pelletiert. Das Pellet wird in einer kleinen Menge K3 Medium aufgenommen und wie im nächsten Abschnitt beschrieben kultiviert. Alternativ können die Protoplasten nach Hain et al. 1985 transformiert werden.

d) Kultur der mit DNA inkubierten Protoplasten und Selektion hygromycinresistenter Kalli

Für die im folgenden beschriebene Kultur und Selektion Hygromycin resistenter Kolonien wird eine modifizierte "Bead Type culture"-Technik (Shillito et al. 1983) verwendet. Eine Woche nach Behandlung der Protoplasten mit DNA (vgl. c) werden 3 ml der Zellsuspension mit 3 ml K3 Medium (6,3 M Saccharose + Hormone; 1,2% Seaplaque) LMT Agarose (low melting agarose, Marine Colloids) in 5 cm Petrischalen gemischt. Für diesen Zweck wird Agarose trocken autoklaviert und nach Zugabe von K3 Medium im Mikrowellenherd kurz aufgekocht. Nach Erstarren der Agarose werden die Agarosescheiben ("beads") mit den eingebetteten Tabakmikrokalli für weitere Kultur und Selektion in 10 cm Petrischalen transferiert und je 10 ml K3 Medium (0,3 M Saccharose, 1 mg/l NAA, 0,2 mg/l Kinetin) und 25 mg/l Hygromycin (Sigma) addiert.

Das Flüssigmedium wird jede Woche gewechselt. Dabei wird der osmotische Wert des Mediums stufenweise herabgesetzt.

Pro Woche wird das Austauschmedium (K3 + Km) um 0,05 M an Saccharose (ca. 60 mOsm) reduziert.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 44 46 342 A1

Am-Medium

3,5 g K_2HPO_4
 51,5 g KH_2PO_4
 0,5 g Na_3 Citrat
 0,1 g $MgSO_4 \times 7H_2O$
 1 g $(NH_4)_2SO_4$
 2 g Glukose ad 1 l

5

Medium für sterile Sproßkultur von Tabak

10

Macro-elemente 1/2 der Konzentration der MS Salze

Micro-elemente 1/2 der Konzentration der MS Salze

15

Fe-EDTA

Murashige und Skoog (MS)

Myo-Inosit

100 mg/l

20

Sucrose

10 mg/l

Agar

8 g/l

25

Vitamine

Ca-panthotenat

1 mg/l

Biotin

10 mg/l

30

Nicotinsäure

1 mg/l

Pyridoxin

1 mg/l

35

Thiamin

1 mg/l

pH 5,7 vor dem Autoklavieren

40

45

50

55

60

65